

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STOSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Danijela Tolić

**UTJECAJ LOKACIJE MASLINIKA I DODATKA
ANTIOKSIDANASA NA OKSIDACIJSKU STABILNOST ULJA
MASLINA SORTE *OBLICA***

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj 2015.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambenu tehnologiju
Katedra za Prehrambeno inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Tehnologija ulja i masti
Tema rada: je prihvaćena na X. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek akademske godine 2013/2014 održanoj 10.07.2014.
Mentor: izv. prof. dr. sc. Tihomir Moslavac
Pomoć pri izradi: Kemijski tehničar, Daniela Paulik

UTJECAJ LOKACIJE MASLINIKA I DODATKA ANTIOKSIDANASA NA OKSIDACIJSKU STABILNOST ULJA MASLINA SORTE *OBLICA*

Danijela Tolić, 194-DI

Sažetak:

Oksidacijsko kvarenje jedno je od glavnih problema tijekom proizvodnje, prerade i skladištenja maslinovog ulja.

U ovom radu istraživao je utjecaj dodatka prirodnih antioksidanasa (ekstrakta zelenog čaja, ekstrakta maslinovog lista, ekstrakta nara, ekstrakta ružmarina tipa OxyLess CS, eteričnog ulja rtanjskog čaja) u udjelima 0,1%, 0,2% i 0,05% (eterično ulje rtanjskog čaja) na oksidacijsku stabilnost ili održivost ekstra djevičanskog maslinovog ulja dobivenog iz sorte *Oblica*, uzgojene uz obalu mora i u zaleđu Biograda. Određivanje oksidacijske stabilnosti provedeno je testom ubrzane oksidacije ulja Schaal Oven testom (63 °C).

Rezultat oksidacije izražen je peroksidnim brojem tijekom četiri dana testa. Dodatkom ekstrakta ružmarina i zelenog čaja efikasnije se štiti maslinovo ulje sorte *Oblica* uzgojeno uz obalu mora, kao i maslinovo ulje uzgojeno u zaleđu. Dodatkom ekstrakta maslinovog lista i ekstrakta nara ne postiže se porast stabilnosti maslinovog ulja uzgojenog uz obalu mora kao ni onog uzgojenog u zaleđu. Efikasniji učinak dodatka antioksidanasa vidljiv je kod maslinovog ulja sorte *Oblica* uzgojene uz obalu mora u odnosu na ono sorte *Oblica* uzgojene u zaleđu Biograda

Ključne riječi: maslinik, *Oblica*, maslinovo ulje, oksidacijsko kvarenje, antioksidansi

Rad sadrži: 53 stranica
4 slike
4 tablice
29 literaturna referenca

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|--|---------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. Andrija Pozderović | predsjednik |
| 2. izv. prof. dr. sc. Tihomir Moslavac | član-mentor |
| 3. izv. prof. dr. sc. Vedran Slaćanac | član |
| 4. izv. prof. dr. sc. Jurislav Babić | zamjena člana |

Datum obrane: 17. srpnja 2015 godine

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food Technology
Subdepartment of Food Engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Technology of oils and fats
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no. X held on 10.july, 2015.
Mentor: Tihomir Moslavac, PhD, associate prof.
Technical assistance: Daniela Paulik, Chemical technical

The impact of location of olive grove and antioxidants on oxidative stability of olive oil type
Oblica
Danijela Tolić, 194-DI

Summary:

Oxidative decay is one of the main problems during the production, processing and storage of olive oil. In this study the effect of the addition of natural antioxidants (green tea extract, olive leaf extract, pomegranate extract, rosemary extract type OxyLess CS, essential oils of winter savory) in the proportions of 0.1%, 0.2% and 0.05% (essential oil winter savory) on oxidative stability and sustainability of extra virgin olive oils obtained from the variety of forms, grown along the coast and in the hinterland of Biograd.

Determination of the oxidative stability test was conducted by accelerated oil oxidation Schaal oven test (63 ° C).

The result of oxidation is expressed by peroxide value during the four days of the test. Addition of rosemary extract and green tea effectively protects olive oil made from *Oblica* grown along the coast, as well as olive oil grown in the hinterland. The addition of olive leaf extract and pomegranate extract is not achieved by an increase in the stability of olive oil grown at the coast as well as those grown in the hinterland. More efficient additive effect of antioxidants is seen in the olive oil made from *Oblica* grown on the coast compared to olive oil made from *Oblica* grown in the hinterland of Biograd.

Key words: olive grove, *Oblica*, olive oil, oxidative decay, antioxidants,
Thesis contains: 53 pages
4 figures
4 tables
29 references
Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. Andrija Pozderović, PhD, associate prof. | chair person |
| 2. Tihomir Moslavac, PhD, associate prof. | supervisor |
| 3. Vedran Slaćanac, PhD, associate prof. | member |
| 4. Jurislav Babić, PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: July 17th, 2014.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem se:

Mentoru izv. prof. dr. sc. Tihomiru Moslavcu na pomoći prilikom odabira teme te stručnom usmjeravanju pri izradi diplomskog rada.

Zahvaljujem se i tehničarki Danieli Paulik na praktičnoj pomoći tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem svojim dragim roditeljima na podršci i razumijevanju tijekom studiranja

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1. SASTAV PLODA MASLINE..... | 2 |
| 2.2. UTJECAJ UZGOJNIH ČIMBENIKA NA KAKVOĆU ULJA | 4 |
| 2.3. PROIZVODNJA MASLINOVOG ULJA | 7 |
| 2.3.1. Pranje plodova i uklanjanje nečistoća..... | 7 |
| 2.3.2. Mljevenje | 7 |
| 2.3.3. Miješanje..... | 7 |
| 2.3.4. Izdvajanje ulja iz maslinovog tijesta | 8 |
| 2.3.5. Odvajanje ulja od biljne (vegetabilne) vode..... | 8 |
| 2.3.6. Bistrenje ulja..... | 9 |
| 2.3.7. Skladištenje..... | 9 |
| 2.3.8. Ulje od ploda i koma masline..... | 9 |
| 2.4. VRSTE KVARENJA BILJNIH ULJA..... | 11 |
| 2.4.1. Enzimski i mikrobiološki procesi | 11 |
| 2.4.2. Kemijski procesi..... | 12 |
| 2.5. STABILIZACIJA BILJNIH ULJA..... | 15 |
| 2.5.1. Antioksidansi | 15 |
| 2.5.2. Sinergisti..... | 18 |
| 2.6. METODE ODREĐIVANJA OKSIDACIJE ULJA | 19 |
| 2.6.1. Kemijski pokazatelji stupnja oksidacije ulja i masti..... | 22 |
| 2.7. OKSIDACIJA STABILNOSTI ULJA | 23 |
| 2.7.1. Oven test ili Schaal Oven test..... | 24 |
| 2.7.2. AOM (Active Oxygen Method) test ili Swift test..... | 24 |
| 2.7.3. Rancimat test | 24 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO..... | 25 |
| 3.1. ZADATAK..... | 25 |
| 3.2. MATERIJALI I METODE | 25 |
| 3.2.1. Materijali | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.2. Metode rada | 26 |
| 3.2.2.1. Priprema uzoraka | 26 |
| 3.2.2.2. Određivanje slobodnih masnih kiselina (SMK) | 26 |
| 3.2.2.3. Određivanje peroksidnog broja (Pbr) | 27 |
| 3.2.2.4. Određivanje oksidacijske stabilnosti ulja-Oven test..... | 28 |
| 4. REZULTATI | 29 |
| 5. RASPRAVA | 32 |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 35 |
| 7. LITERATURA | 36 |

Popis oznaka, kratica i simbola

| | |
|----------------------|---------------------------------|
| PTF | Prehrambeno-tehnološki fakultet |
| SMK | Slobodne masne kiseline |
| EMK | Esencijalne masne kiseline |
| Pbr | Peroksidni broj |
| Abr | Anisidinski broj |
| RH | Masne kiseline |
| $R\cdot$, $RO\cdot$ | Slobodni radikali |
| $ROO\cdot$ | Radikal peroksida |
| ROOH | Hidroperoksid |
| $HOO\cdot$ | Radikal vodikovog peroksida |
| R–R, ROOR | Polimeri |
| AH | Antioksidansi |
| BHA | Butil hidroksianisol |
| BHT | Butil hidroksitoluen |
| PG | Propil galat |
| IP | Indukcijski period |

1.UVOD

Masline su plodovi zimzelenog drveta *Olea europaea L.*, koje raste u mediteranskom području (kod nas u Dalmaciji i Primorju). Plod masline ima mesnato usplođe puno ulja, a iznutra je koštica sa sjemenkom, u kojoj također ima ulja, ali slabije kvalitete. Maslinovo ulje dobiva se postupkom mljevenja (gnječenja) i prešanja zrelih plodova masline. Kvalitetno ulje je tamnozeleno, prozirno i bez trpkoga okusa. Najveći dio ulja (više od 95%) čine masne kiseline, od kojih je najzastupljenija mononezasićena oleinska kiselina (65–85%).

Najcjenjenije je ekstra djevičansko maslinovo ulje ili prvo maslinovo ulje, koje se dobiva prvim prešanjem sirovine. Ono sadrži najveći dio ekstraktivnih (aromatičnih) tvari i tamnozelene je boje. Kiselost ulja je (izraženo u oleinskoj kiselini) do 0,8%, što označava najkvalitetniji tip maslinovog ulja.

Poznavanje oksidacijske stabilnosti (održivosti) ulja je bitno jer je maseni udio slobodnih masnih kiselina u ulju standardni tržišni pokazatelj hidrolitičkog kvarenja ulja. Što je oštećenje ploda bilo veće i što je duže vrijeme proteklo od oštećenja ploda do ekstrakcije ulja, to je pokazatelj SMK veći. Pokazalo se da povećani udio SMK smanjuje oksidacijsku stabilnost ulja u uvjetima ubrzane oksidacije te da svojim djelovanjem preko karboksilne skupine vežu i ubrzavaju razgradnju peroksida. SMK tijekom čuvanja ulja dodatno potiču i hidrolizu aglikona sekoiridoida, glavnih fenolnih sastojaka djevičanskih maslinovih ulja, pri čemu raste koncentracija fenolnih alkohola. Posljedice porasta koncentracija fenolnih alkohola očituje se u većjoj trpkosti, te smanjenoj gorčini i pikantnosti ulja, tj. ima utjecaj na okusna svojstva maslinovog ulja.

Metode koje se danas najčešće primjenjuju za određivanje oksidacijske stabilnosti ili održivosti biljnih ulja temeljene su na ubrzanoj oksidaciji ulja, a to su Rancimat test i OSI indeks, Schaal oven test i AOM test.

Stabilnost biljnih ulja prema oksidacijskom kvarenju može se poboljšati dodatkom antioksidanasa, a to su tvari koje inhibiraju, usporavaju autooksidacijsko kvarenje ulja. Za oksidacijsku stabilnost biljnih ulja primjenjuju se razni sintetski i prirodni antioksidansi.

Zadatak ovog rada je bio ispitivanje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja dobivenog iz ploda masline sorte *Oblica* uzgojene uz obalu mora i u zaleđu, primjenom Oven testa. Također se pratio utjecaj dodatka prirodnih antioksidanasa: ekstrakta zelenog čaja, ekstrakta nara, ekstrakta ružmarina tip OxyLess CS, ekstrakta maslinovog lista udjela 0,1% i 0,2% te eteričnog ulja rtanjskog čaja udjela 0,05% na promjenu oksidacijske stabilnosti ovog ulja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. SASTAV PLODA MASLINE

Plod masline građen je slično plodovima ostalog koštičavog voća, osnovni su mu anatomske dijelovi kožica (epikarp), pulpa (mezokarp) i koštica (endokarp), unutar koje se nalazi sjemenka (endosperm).

Kožica ploda masline

Kožica masline građena je od sloja epidermalnih stanica iznad kojeg se nalazi kutikula prekrivena masno-voštanom prevlakom, sastavljenom od oko 40% triacilglicerola, 30% triterpenskkih kiselina, 20% alifatskih i triterpenskkih alkohola te oko 10% voskova i drugih tvari. Prilikom prerade maslina, masno-voštana prevlaka dolazi u kontakt s uljem pa se dio ovih tvari u njemu otapa i postaje njegov sastavni dio. Kožica je i dio ploda koji u najvećoj mjeri sadrži tvari boje – lipofilne klorofile, karotene i ksantofile, te hidrofilne antocijane. Tijekom dozrijevanja koncentracija klorofila, ksantofila i karotena se progresivno smanjuje i boja kože poprima od zelene do zeleno-žute nijanse do pojave ljubičastih ili crvenih mrlja koje ukazuju na početak sinteze antocijana (Koprivnjak, 2006).

Pulpa ploda masline

Pulpa ploda je građena od stanica čija je primarna stanična stijenka sastavljena od celuloze, pektoceluloze i hemiceluloze. U međustaničnom prostoru nalazi se tanka središnja lamela sastavljena od pektina koji povezuje susjedne stanice i tkivo, dajući mu čvrstoću. U preradi maslina ove tvari dolaze u kontakt s vodom i iskazuju svoja koloidna svojstva te mogu za posljedicu imati otežano izdvajanje ulja tijekom prerade maslina.

Za stanicu pulpe karakteristično je nakupljanje ulja u vakuolama, svojevrsnim uljnim mjehurićima s membranama koje ih odvajaju od ostalog vodenog sadržaja citoplazme. U zreom plodu takve vakuole ispunjavaju preko 80% volumena stanica.

U vodenom dijelu citoplazme sadržani su šećeri, organske kiseline, enzimi, fenoli i druge u vodi topljive tvari. Od šećera su najzastupljenije glukoza i fruktoza, dok se saharoza i manitol javljaju u vrlo malim količinama.

Od organskih kiselina u plodu masline najzastupljenije su limunska, jabučna i oksalna kiselina, koje se pretežito javljaju u obliku soli, a koje pulpi maslina osiguravaju pH u rasponu 4,5-5.

Fenolne tvari u stanicama ploda masline (fenolne kiseline i alkoholi te sekoiridoidi) poznate pod nazivom biofenoli, javljaju se u vidu nakupina, odnosno vakuola smještenih neposredno uz staničnu stijenku. Biološka uloga biofenola je u prvom redu zaštita od mikroorganizama na mjestima oštećenja ploda masline, te odbijanje nametnika i biljojeda. U ulju se otopi tek 0,5-1% od ukupne količine fenolnih tvari, a one su od izuzetno velike važnosti za okusno-mirisna i nutritivna svojstva te za trajnost djevičanskih maslinovih ulja (Koprivnjak, 2006).

Sjemenka koštice masline

Sjemenka masline sadrži u sebi znatan dio ulja (35-40%), no s obzirom na njen mali maseni udio u plodu, to ulje predstavlja tek 5-7% od ukupne količine ulja u svježem plodu. Za sjemenku i ulje dobiveno iz sjemenke karakterističan je veći udio tokoferola, prisutnost specifičnih fenolnih tvari kao što je nuzhenid, znatno veći dio linolne kiseline i ukupnih sterola, te znatno veća lipokisigenaza i peroksidaza u odnosu na kožicu u pulpu ploda masline.



Slika 1 Plod masline sorta *Oblica*

2.2. UTJECAJ UZGOJNIH ČIMBENIKA NA KAKVOĆU ULJA

Među karakteristikama okoliša ističe se toplina podneblja, među agronomskim mjerama ističe se odabir sorte, navodnjavanje, dostupnost vode i stupanj zrelosti plodova, a od postupaka koji prethode preradi najutjecajniji je način čuvanja plodova.

Utjecaj sorte

U svijetu se uzgaja gotovo 1300 sorti maslina, iako se samo nekoliko desetaka smatra značajnijim, s obzirom na količinu proizvedenog ulja. Samo neke od sorti koje se najviše koriste i uzgajaju su podvrste *Olea europea sativa L.* – pitome masline ili uljike, a koja se još naziva i *Oblica*.

Oblica je vodeća i najrasprostranjenija sorta masline u Hrvatskoj koja je prisutna u svim našim maslinarskim područjima, osim u Istri, gdje je zastupljena tek među mladim maslinicima. Njezina dobra svojstva su relativno krupan plod i stablo koje je otporno na vjetar. *Oblica* je veoma osjetljiva na maslinovu muhu i sklona je naizmjeničnoj rodnošći. Boljom agrotehnikom elaiotehnikom pokušava se ublažiti njen glavni nedostatak - neredovita rodnošć (Benčić i sur., 2010).

Uglavnom je rasprostranjena u priobalnom pojasu Sredozemnog mora, gdje vlada mediteranska klima, s tim da maksimalna temperatura iznosi 40, a minimalna -7. Najbolje uspijeva na blagim padinama nad morem i prozračnim položajima na kojima donosi dobre i redovite prinose. Traži dovoljno sunca, svjetla i južne ekspozicije. Svjetlo je bitan čimbenik jer lišće koje nije uzloženo sunčevom svjetlu ne stvara hranu, zbog toga se u maslinicima zasjenjenim borovim šumama maslina ne razvija i ne rađa (Mimica, 1991).

Kod izbora sorata preporuča se sadnja mješovitih nasada domaćih sorata koje pokazuju redovitu rodnošć i već isprobanih unesenih sorata kao što su: *Leccino*, *Coratina*, *Pendolino* i dr. kao oprašivač (Mimica, 1991).

Ulja dobivena zasebnom preradom plodova pojedinih sorti (sortna ulja) uz odabir optimalnog stupnja zrelosti plodova i uvjeta prerade, mogu se razlikovati prepoznatljivim mirisnim svojstvima. Poznato je da određene sorte daju ulju izrazite gorčine i pikantnost npr. istarska bjelica, dok druga daju ulja nježnog okusa npr. *Oblica*.

Utjecaj lokacije maslinika

Što se tiče tla, maslina uspjeva na najškrtijim kamenitim i dubokim plodnim tlima, s tim da na plodnijim tlima donosi bogatije prinose. Za maslinu nisu pogodna teška, glinovita tla nepropusna za vodu i zrak kao ni pjeskovita tla koje ne zadržavaju vodu, osim ako se ne može osigurati navodnjavanje. Duboka tla, propusna za zrak i vodu sa dovoljnim količinama organskih tvari osnova su uspješnog uzgoja maslina, redovitih i visokih prinosa (Mimica, 1991).

Na primjeru jednog istraživanja provedenog u Istri vidljivo je da lokacija maslinika ima utjecaj na kakvoću ulja. Jedan od maslinika smješten je uz obalu mora, a drugi na nadmorskoj visini od 250 m. Promatrao se masno-kiselinski sastav ekstra djevičanskih ulja određivan u uljima dobivenih od sorti "*Leccino*" i "*Buža*".

Rezultati kemijskih analiza ukazuju na značajne razlike u udjelu palmitinske, palmitooleinske, oleinske, stearinske, linolne, linolenske, arahinske te gadoleinske kiseline u ekstra djevičanskim maslinovim ulja, ovisno o lokalitetu i sorti. Veće količine palmitinske i manje količine stearinske i arahinske kiseline utvrđene su u uljima obiju sorti u toplijem području. S druge strane znatno veće količine oleinske, linolne i linolenske kiseline utvrđene su u uljima sorte Leccino u hladnijem području, a kod sorte Buža u toplijem (Benčić i sur., 2009).

Utjecaj količine ploda po stablu

U slučaju manje opterećenosti, plodovi su u prosjeku veće mase i dimenzije, sadrže više suhe tvari i veći udio ulja u suhoj tvari, a njihovo dozrijevanje je brže i ujednačenije (Koprivnjak, 2006).

Utjecaj zrelosti plodova

Tijekom zrenja ploda, uslijed djelomične dezintegracije tkiva uslijed sve jačeg djelovanja hidrolitičkih enzima postoji blagi porast udjela slobodnih masnih kiselina kod crnih maslina. Okusno mirisna svojstva u većoj mjeri ovise o zrelosti plodova. Ulja dobivena iz ljubičastih i crnih maslina u prosjeku imaju ocjene koje ukazuju na gubitak poželjnih te prisutnost nepoželjnih mirisnih tvari. Gorčina ulja se značajno smanjuje u fazi promjene boje plodova iz ljubičaste u crnu. Budući da je intenzitet gorčine u vezi s koncentracijom fenolnih tvari, razumljivo je da se proporcionalno smanjuje i oksidacijska stabilnost ulja.

Može se zaključiti da berba i prerada djelomično zrelih plodova pruža veću vjerovatnost za proizvodnju ulja visoke kakvoće. S druge strane količina ulja koja se dobiva iz maslina vrlo malo ovisi o zrelosti ploda. Naime, za većinu sorti sinteza ulja u plodu zaustavlja se u trenutku kad maslina postaje prošarana, a nakon toga u plodu više nema nakupljanja ulja već se javlja samo postupni gubitak vode.

Toplina podneblja značajno utječe na dinamiku dozrijevanja plodova, a time neposredno i na sastav ulja. Više nadmorske visine i hladnija područja uzgoja masline odražavaju se u većoj zastupljenosti nezasićenih te manjoj zastupljenosti zasićenih masnih kiselina u ulju. Osobit utjecaj pripisuje se učestalosti dnevnih temperaturnih varijacija ispod 15 °C u ljetnim mjesecima, koje potiču nakupljanje oleinske kiseline, na uštrb palmitinske i linolne. Ulja iz hladnijih područja uzgoja maslina općenito su bogatija mirisima po zelenilu, što se može pripisati pozitivnom utjecaju nižih temperatura na aktivnost enzima u lipoksigenaznom putu. Toplota područja izgleda potiču nakupljanje većih količina ukupnih fenolnih tvari u ulju.

Utjecaj čuvanja plodova

Plodove maslina bi nakon berbe trebalo preraditi u najkraćem mogućem roku, u idealnom slučaju istog dana kada su i ubrani. No u situacijama kad se moraju uskladištiti do prerade najvažnije je usporiti dozrijevanje, odvesti višak topline koji se oslobađa prilikom dozrijevanja, spriječiti mehaničko oštećenje plodova, te spriječiti razvoj mikroorganizama. Najlakši način za postizanje ovih ciljeva je čuvanje maslina u hladnjačama, pri temperaturi od 5°C do 8°C, no ono poskupljuje proizvodnju ulja pa se rijetko primjenjuje. Masline se uglavnom skladište u prohladnom i zračnom prostoru, rasprostrte na podu od materijala koji se lako peru ili rapoređene u drvene lijesce. Čest je i način čuvanja u plastičnim ili mrežastim vrećama, a osim toga postoji i praksa čuvanja plodova u morskoj vodi ili pitkoj vodi. Čuvanje plodova u vodenim medijima usporilo je hidrolitičko i oksidacijsko kvarenje ulja, te se pri čuvanju u morskoj vodi kod maslina izgubi opor i gorak okus prilikom prerade u ulje.

2.3. PROIZVODNJA MASLINOVOG ULJA

2.3.1. Pranje plodova i uklanjanje nečistoća

Plodovi koji se dovoze u pogon za preradu sadrže nečistoće u vidu lišća, grančica, zemlje, kamenja i sl. Nečistoće mogu negativno utjecati na kakvoću ulja, oštećivati dijelove strojeva, te umanjiti efikasnost ekstrakcije. Veće grančice se uklanjaju usipavanjem maslina u prijemni koš kroz rešetku, lišće i sitnije grančice uklanjaju se strujom zraka, a ostaci zemlje i druge tvari peru se s površine ploda kratkotrajnim namakanjem i konačnim ispiranjem vodom.

2.3.2. Mljevenje

Cilj drobljenja i usitnjavanja ploda prvenstveno je osloboditi kapljice ulja iz vakuole i tako omogućiti njihovo izdvajanje u kasnijim fazama prerade. To teoretski znači da je za što djelotvorniju ekstrakciju ulja nužno u što većoj mjeri razoriti staničnu strukturu ploda. Tijekom opve operacije razaraju se i stanične strukture ostalih dijelova ploda pa specifične tvari sadržane u njihovim stanicama također dolaze i u izravan dodir s uljem, s njim reagiraju ili se u njemu otapaju tijekom ove i kasnijih operacija. Tijekom mljevenja može se javiti i neželjena pojava stvaranje emulzije. Dakle mljevenje treba provesti na način da se iz pulpe oslobodi što više ulja, a da se ono pri tome što manje rasprši u sitne kapljice i što manje dovode u stanje emulzije. Usitnjavanje ploda moguće je provesti različitim izvedbama kamenih mlinova ili mlinova sa rotirajućim metalnim dijelovima (čekićima, diskovima ili konusnim valjcima).

2.3.3. Miješanje

Cilj operacije je da se u što većoj mjeri razbije emulzija i kapljice ulja ujedine do promjera većih od 30 μm , kada ih je moguće izdvojiti u daljnjem postupku ekstrakcije. Miješenje se uobičajeno odvija u seriji od 2-3 korita od inoks materijala, s metalnim mješačima i s plaštem kroz koji struji topla voda. Sporo miješenje mase (20-40 o/min) izaziva razbijanje preostalih cijelih stanica pod utjecajem lipoproteinske membrane i spajanje manjih u veće kapljice ulja. Tvari koje su se iz vakuola i mikrosomskih membrana oslobodile tijekom mljevenja, sad imaju priliku za raspodjelu između vodene i uljne faze, te za međusobne reakcije. Za kakvoću ulja najvažnije je ono što se tijekom miješenja događa sa pigmentima, triacilglicerolima i masnim kiselinama, fenolnim tvarima i enzimima. Miješanje se provodi u vremenu od 60 minuta pri temperaturi do 30°C uz prisutnost inertnog plina N_2 kako bi se spriječila oksidacija ulja.

2.3.4. Izdvajanje ulja iz maslinovog tijesta

Postupci izdvajanja ulja ili uljnog mošta iz maslinovog tijesta temelje se na jednom od sljedeća tri principa: primjeni sile pritiska (kod prešanja), razlici u gustoći ulja, vode i krutih čestica (kod centrifugiranja) te razlici u površinskoj napetosti ovih triju komponenti (kod procjeđivanja).

Prešanjem se iz maslinovog tijesta izdvaja tzv. uljni mošt tj. mješavina ulja i biljne vode. Sloj maslinovog tijesta debljine oko 3 cm premazuje se preko filtrirajućih slojnica sačinjenih od biljnih ili sintetičkih vlakana. One u sredini imaju otvor koji omogućuje njihovo slaganje kroz središnju cijev na kolicima preše. Uljni mošt skuplja se u kadama presvučenim staklom ili keramikom, bazenima od nehrđajućeg čelika i sl., te se pumpom odvodi u centrifugu, kojom se razdvajaju uljna i vodena faza. Uobičajeno iskorištenje ulja kod prešanja je 85-90%, a najčešće se provodi u otvorenim hidrauličkim prešama.

Centrifugiranjem se razdvaja ulje, biljna voda i kruti dijelovi, a razdvajanje se temelji na razlici u gustoći ovih triju komponenti. U sastavu ulja, jedina značajna razlika javlja se kod centrifugiranja u 3 faze, zbog dodatka vode koja hidrofilne fenolne tvari ispire iz ulja.

Procjeđivanje - uređaji se sastoje od korita s maslinovim tijestom koje se neprestano miješa, te od sustava vrlo tankih pločica od nehrđajućeg čelika, poslaganih u vidu češljeva, koje pri dnu korita naizmjenično ulaze i izlaze iz maslinovog tijesta. Postupak traje oko 30 minuta i njime se uspije procijediti i do 60 % ulja sadržanog u tijestu. Preostala količina uzdvaja se centrifugiranjem.

2.3.5. Odvajanje ulja od biljne (vegetabilne) vode

Posljednja operacija je izdvajanje biljne vode i malih količina čvrstih čestica iz uljnog mošta. Budući da se radi o dvjema tekućinama koje se ne miješaju i koje imaju različite gustoće, ovo se razdvajanje brzo i jednostavno može provesti vertikalnim centrifugama. Ulje koje je manje gustoće kreće se prema osi vrtnje, dok se biljna voda i krute čestice kreću prema perifernom dijelu centrifuge.

2.3.6. Bistrenje ulja

Neposredno nakon prerade, djevičanska maslinova ulja u pravilu su mutna. Mutnoću izazivaju vrlo sitne čestice biljnog tkiva u suspenziji ili disperziji, te vrlo sitne kapljice biljne vode emulgirane u ulju, koje se nisu uspjele izdvojiti centrifugiranjem. Uslijed veće gustoće u odnosu na ulje, ove se nečistoće i kapljice biljne vode talože na dnu i stijenkama spremnika. Talog sadrži u vodi otopljene šećere i bjelančevine te enzime i anaerobne mikroorganizme koji ih mogu razgraditi do tvari neugodnog mirisa po truleži. Talog se stoga uklanja pretakanjem ili se ulje bistri filtriranjem.

Filtriranje se provodi uz upotrebu diatomejske zemlje, metalnih, teflonskih ili celuloznih filtera. U slučaju filtracije većih količina poželjno je raspolagati s filterskim prešama i odgovarajućim filterima. Nefiltrirana ulja predstavljaju nestabilniji sustav, brže degradiraju uz veći rizik za nastanak nepoželjnih mirisa. S druge strane, procesi oksidacije nešto se brže odvijaju u filtriranim uljima jer nakon filtriranja imaju višu vrijednost hidroperoksida u odnosu na ista nefiltrirana ulja.

2.3.7. Skladištenje

U cilju usporavanja oksidacije masnih kiselina i fenolnih tvari te degradacije poželjnih mirisnih tvari, ulje treba čuvati s minimalnim volumenom natprostora u spremniku ili natprostor ispuniti inertnim plinom (dušikom). Spremnik mora zaštititi ulje od svjetlosti, kisika, topline i vlage, biti lako periv, inertan u odnosu na ulje i ne smije u njega otpuštati sastojke. Najčešći materijali spremnika za ulje su inoks čelik, lim, staklo i plastika.

2.3.8. Ulje od ploda i komine masline

Djevičansko maslinovo ulje

Prema Pravilniku o uljima od ploda i komine maslina (NN 63 2006) djevičanska maslinova ulja proizvode se izravno iz ploda masline, isključivo mehaničkim ili drugim fizikalnim postupcima, u uvjetima koji ne dovode do promjene sastojaka ulja, te bez dodataka pomoćnih sredstava kemijskog ili biokemijskog djelovanja. Takva se ulja mogu podvrgavati isključivo postupcima pranja, centrifugiranja, dekantiranja i/ili filtracije.

Maslinovo ulje

Djevičanska maslinova ulja s udjelom slobodnih masnih kiselina većim od 2% i/ili neodgovarajućim senzorskim karakteristikama tj. maslinova ulja lampante, smatraju se neprikladnima za ljudsku uporabu. Osnovne faze rafinacije ulja su neutralizacija, dekoloracija i dezodorizacija.

Neutralizacija – uklanjanje slobodnih masnih kiselina provodi se miješanjem ulja i vruće vodene otopine natrij hidroksida (60-80°C). Na taj način iz slobodnih masnih kiselina nastaju natrijeve soli. Nastala saponica izdvaja se centrifugalnim separatorima, a neutralizirano ulje pere se u više navrata vrućom vodom (80-90°C) kako bi se uklonili tragovi sapuna i viška lužine. Tijekom ovog postupka iz ulja se uklanja i dio eventualno prisutnih hidrofilnih fenolnih tvari.

Dekoloracija - uklanjanje tvari boje temelji se na fizikalnoj adsorpciji obojenih tvari na površini sredstava za bijeljenje (aktivne zemlje i aktivni ugljen), koje se dodaju u ulje zagrijano na 70-100°C. Osim tvari boje, iz ulja se uklone tragovi metala i hidroperoksidi, ali i neki vrijedni sastojci.

Dezodorizacija - uklanjanje hlapljivih sastojaka (aldehida, ketona, estera) koji su nositelji neugodnog mirisa, provodi se vakuum destilacijom vodenom parom pri 180-240°C uz podtlak od 0,5-1 bar. Osim ovih tvari, vodena para odnosi sa sobom i slobodne masne kiseline i peroksidi. Rafinirano ulje gotovo je bez boje, okusa i mirisa pa mu se stoga dodaje mala količina jestivog djevičanskog ulja. Prema Pravilniku o uljima od ploda i komine masline naziv ovog proizvoda je maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranog maslinovog ulja i djevičanskih maslinovih ulja.

Ulje komine masline

Komina, koja sadrži čvrsti ostatak koštica i pulpe nakon prešanja ili centrifugiranja, sadrži u sebi još do 6-8% ulja koje se može ekstrahirati pomoću organskih otapala, kao što suekstrakcijski benzin ili heksan. Tako dobiveno sirovo ulje također se podvrgava rafinaciji, dodaje mu se malo djevičanskog ulja pa nastaje proizvod koji se na tržištu naziva rafinirano ulje komine masline.

2.4. VRSTE KVARENJA BILJNIH ULJA

Biljna ulja su proizvodi ograničene trajnosti, vrlo brzo podliježu nepoželjnim promjenama: kemijskim reakcijama, enzimskim i mikrobiološkim procesima, zbog kojih dolazi do kvarenja ulja. Proces kvarenja ovisi o mnogim čimbenicima, a glavni su kvaliteta ulja i uvjeti čuvanja. Posljedice navedenih promjena su nastanak spojeva koji narušavaju organoleptička svojstva i smanjuju nutritivnu vrijednost ulja gubitkom biološki aktivnih tvari (vitamini, provitamini, esencijalne masne kiseline i dr.), a nastankom nepoželjnih i štetnih tvari kao što su polimeri i peroksidi. Vrlo je važno spriječiti kvarenje ulja već od samog trenutka ubiranja i skladištenja sjemena, ali i tijekom proizvodnje i upotrebe ulja praćenjem odgovarajućih parametara (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980).

Vrste kvarenja biljnih ulja:

- Enzimski i mikrobiološki procesi
- Kemijski procesi

2.4.1. Enzimski i mikrobiološki procesi

Za ove procese kvarenja neophodno je prisustvo enzima ili mikroorganizama, odgovarajuća sredina i uvjeti (količina vode, pH, optimalna temperatura) za njihov razvoj. Enzimski procesi su karakteristični za sirovine. Sjeme diše te oslobađa toplinu koja povećava temperaturu koja dalje povećava aktivnost autohtonih enzima. Stoga je važno pravilno skladištiti sjemenke i plodove uljarica pod odgovarajućim uvjetima kako ne bi izazvalo kvarenje.

Procese koji uzrokuju mikroorganizmi značajni su za proizvode koji sadrže masti i ulja i dijele se na hidrolitičku razgradnju i β -ketooksidaciju.

Hidrolitička razgradnja je reakcija hidrolize triglicerida pod utjecajem endogenih lipaza pri kojoj dolazi do cijepanja esterske veze masnih kiselina i alkohola glicerola u prisutnosti vode i enzima lipaze. Temperatura veća od 80 °C i niža od -20 °C inaktivira lipolitičke enzime te dovodi do zaustavljanja procesa hidrolitičke razgradnje ulja (Rade i sur., 2001). Do ove razgradnje dolazi prvenstveno u ulju unutar ploda masline, ali i u izdvojenom ulju, ako je u dodiru s vodom i ako se čuva u neprikladnim uvjetima te kao posljedica nastaju slobodne masne kiseline. Oslobađanjem masnih kiselina povećava se kiselost ulja i nastaju monogliceridi, digliceridi i glicerol. Stupanj nastalih hidrolitičkih promjena se prati

određivanjem udjela slobodnih masnih kiselina (SMK). Rafinirana jestiva ulja mogu sadržavati do 0,3 % slobodnih masnih kiselina izraženih kao postotak oleinske kiseline (Pravilnik o jestivim uljima i mastima NN 41/12).

β -ketooksidacija je proces kvarenja karakterističan za ulja i masti u čijem sastavu prevladavaju masne kiseline kraćeg i srednjeg lanca. Nastaje pod djelovanjem mikroorganizama, plijesni iz grupe *Aspergillus* i *Penicillium* te bakterije iz grupe *Bacillus mesentericus* i *Bacillus subtilis*. Posljedica ovog kvarenja je nastanak β -keto kiselina kao primarnih produkata i metil ketona kao sekundarnih produkata reakcije. Ukoliko je prisutna voda, mogu nastati dvije masne kiseline umjesto metil ketona. Već u malim koncentracijama metil ketoni narušavaju organoleptička svojstva odnosno dovode do užglosti ulja i masti.

Ovu vrstu kvarenja ulja i masti moguće je spriječiti pasterizacijom, sterilizacijom, snižavanjem pH vrijednosti ispod 5 i primjenom određenih konzervansa.

2.4.2. Kemijski procesi

Kemijski procesi kvarenja biljnog ulja su:

- Autooksidacija
- Termooksidacijske promjene
- Reverzija

Autooksidacija

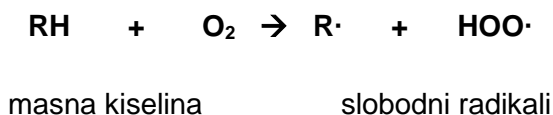
Autooksidacija ulja je vrsta kemijskog kvarenja koja nastaje tijekom vezanja kisika iz zraka na dvostruke veze nezasićenih masnih kiselina što dovodi do njihove oksidacije, odnosno autooksidacije, jer nastali produkti katalitički pospješuju daljni tijek oksidacije. Autooksidacija može biti brža ili sporija što ovisi o sastavu ulja, uvjetima čuvanja, prisutnosti sastojaka koji ubrzavaju (prooksidansi) ili usporavaju (antioksidansi) oksidaciju. Također na povećanje brzine autooksidacije utječu povišene temperature, svjetlo i tragovi metala. Ulja s većim udjelom polinezasićenih masnih kiselina podložnija su autooksidacijskim promjenama.

Autooksidacija je lančana reakcija koja se odvija u tri faze (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980.; Rade i sur., 2001).

Faze autooksidacije ulja:

1. Inicijacija – prva faza oksidacije

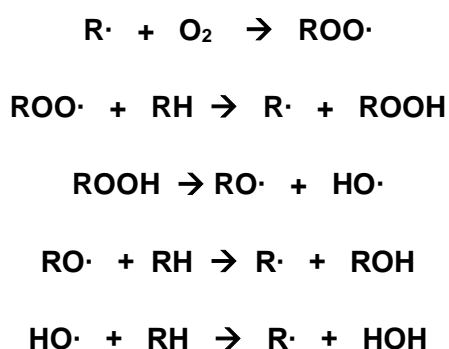
Početak autooksidacije ulja temelji se na nastanku slobodnog lipidnog radikala ($R\cdot$) pod pretpostavkom da kisik iz zraka pri djelovanju na masnu kiselinu daje radikale po reakciji:



Nastanak početnog slobodnog radikala masne molekuleove lančane reakcije, osim kisika, može izazvati i prisutnost iona metala, utjecaj svjetlosti, radijacije i dr. Prva faza oksidacije je usporena zato što još nema nastalih hidroperoksida ili se oni nalaze u malim količinama.

2. Propagacija – druga faza oksidacije

U fazi inicijacije nastaju slobodni radikali masnih kiselina ($R\cdot$) koji reagiraju s kisikom tvoreći peroksi – radikale ($\text{ROO}\cdot$). Peroksi – radikali oduzimaju vodik iz molekula masnih kiselina i oslobađaju nove radikale masnih kiselina ($R\cdot$) i hidroperoksidi (ROOH). Hidroperoksidi su nestabilni te se raspadaju na dva nova radikala $\text{RO}\cdot$ i $\text{HO}\cdot$. Također, svaki od njih oduzima vodik iz molekule masnih kiselina i tako ponovno nastaju novi radikali $R\cdot$, koji dalje pokreću novi niz lančanih reakcija.



Primarni produkti (peroksidi i hidroperoksidi) i sekundarni (aldehidi, ketoni, alkoholi, masne kiseline, epoksidi i dr.) koji nastaju u ovim reakcijama daju ulju neugodan, užegnut okus i miris. Ti produkti narušavaju senzorska svojstva ulja čak i u malim količinama (Broadbent i Pike, 2003). Oksidacijom ulja gube se esencijalne masne kiseline, dolazi do oksidacije vitamina i provitamina dok nastali produkti djeluju toksično. Za autooksidaciju ulja su ključne polinezasićene masne kiseline zbog njihove brže oksidacije u odnosu na mononezasićene i zasićene masne kiseline.

3. Terminacija – završna faza oksidacije

U završnoj fazi reakcije autooksidacije slobodni radikali masnih kiselina međusobno se spajaju dajući polimere, a posljedica toga je porast viskoznosti, tamnjenj uja i otežana probavljivost ulja.



Termooksidacija

Termooksidacijske promjene ulja se događaju tijekom zagrijavanja ulja, prženjem na temperaturama višim od 150 °C u prisustvu vodene pare i zraka (Vidyasagar i sur., 1974.).

Pored termooksidacijskih promjena nastaju i ciklične masne kiseline, dimeri, polimeri, oksipolimeri i drugi hlapljivi spojevi. Stupanj termooksidacije ovisi o vrsti ulja, temeperaturi i vremenu zagrijavanja. Ulja sa visokim udjelom nezasićenih masnih kiselina, pogotovo linolne kiseline (npr. suncokretovo ulje s udjelom linolne kiseline od 60 do 75 %), su izuzetno nestabilna ulja. Tijekom prženja hrane može se apsorbirati i do 40% ulja, te se mijenjaju fizikalna svojstva ulja i to indeks refrakcije, specifična težina, viskozitet i boja ulja. Pored fizikalnih svojstava, mijenjaju se i kemijska pri čemu dolazi do porasta udjela slobodnih masnih kiselina, broja osapunjenja, peroksidnog broja, a smanjenje jednog broja.

Reverzija

Pojava koja je karakteristična za pojedina biljna ulja prilikom koje se nakon kraćeg vremena čuvanja javlja neugodan miris i okus na sirovinu, ribu i drugo. Tijekom zagrijavanja ulja miris i okus postaju izraženiji.

Primjena djelomične hidrogenacije (zbog uklanjanja linolenske kiseline) ili dodatak aditiva (za povećanje održivosti ulja) koriste se za usporavanje reverzije (Oštrić-Matijašević i Turkulov, 1980).

2.5. STABILIZACIJA BILJNIH ULJA

Oksidacijska stabilnost različitih biljnih ulja prvenstveno ovisi o vrsti ulja odnosno o sastavu masnih kiselina i o udjelu prirodnih antioksidanasa u ulju. Tvari, koje usporavaju propagaciju tako da deaktiviraju slobodne radikale, su od velikog značaja za oksidacijsku stabilnost ulja to jest za zaustavljanje ili usporavanje osidacije ulja.

Oksidacijska stabilnost prvenstveno ovisi o vrsti ulja, odnosno o sastavu masnih kiselina, budući da su polinezasićene masne kiseline reaktivnije od mononezasićenih i zasićenih masnih kiselina te oksidiraju puno brže. Kako bi se spriječila oksidacija i kako bi se poboljšala stabilnost biljnih ulja dodaju se antioksidansi odnosno tvari koje usporavaju propagaciju tako da deaktiviraju slobodne radikale.

2.5.1 Antioksidansi

Antioksidansi su tvari koje inhibiraju oksidaciju drugih tvari, dodaju se uljima i mastima u vrlo malim koncentracijama za sprečavanje procesa oksidacijskog kvarenja te produžuju održivost ili stabilnost ulja. To su spojevi koji usporavaju autooksidaciju ulja. Antioksidansi su tvari koje štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala.

Svaka zemlja svojim zakonskim regulativama određuje koji antioksidansi i u kojoj količini su dozvoljeni kao aditivi radi povećanja oksidacijske stabilnosti ulja.

Mehanizam djelovanja antioksidansa

Uklanjanjem ili deaktivacijom slobodnih peroksi-radikala ($\text{ROO}\cdot$) ili radikala masnih kiselina ($\text{R}\cdot$) dolazi do inhibicije ili prekida lančane reakcije procesa autooksidacije ulja, prije nego što oni kataliziraju nove reakcije tijekom procesa oksidacije.

Mehanizam djelovanja antioksidansa (AH):





Antioksidans (AH) kao donor vodikovog atoma "hvata" slobodne radikale ($\text{R}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$), daje jedan elektron nesparenom elektronu slobodnog radikala i reducira ga čime ometa fazu propagacije te se ujedno zaustavlja ili inhibira lančana reakcija autooksidacije.

Na početku nastaju slobodni radikali antioksidansa ($\text{A}\cdot$) koji su stabilni. Oni nemaju dovoljno energije za daljnju reakciju i nastajanje novih slobodnih radikala zbog čega se inhibira ili prekida lančana reakcija oksidacije i time se produžava oksidacijska stabilnost ili održivost ulja.

Antioksidansi mogu spriječiti inicijaciju (indukcijski period) autooksidacije, propagaciju autooksidacije, stvaranje singlet kisika, razaranje hidroperoksida na kratkolančane spojeve, stadij u kojem se radikali peroksida i hidroperoksida pregrađuju i daju izomerne spojeve koji utječu na okus.

Na osnovu kemijske građe pa time i različitih mehanizama antioksidacijskog djelovanja, razlikuje se nekoliko tipova antioksidanasa.

Antioksidansi se mogu podijeliti na primarne i sekundarne, ovisno o tome na koju fazu procesa oksidacije djeluju. Njihova djelotvornost ovisi prvenstveno o vrsti ulja kojem se dodaju, jer različita ulja imaju različit sastav masnih kiselina kao i različit udio antioksidansa koji su već prisutni u ulju. Učinak djelotvornosti antioksidansa također ovisi o temperaturi (mehanizam nastajanja i razgradnje hidroperoksida), te o primjenjenoj metodi, jer jedne metode određuju primarne, a druge metode određuju sekundarne produkte oksidacije ulja. Od velike je važnosti da se antioksidansi dodaju u ulja niskog peroksidnog broja (<1) zato što će samo u tom slučaju antioksidans biti djelotvoran i spriječiti oksidaciju. Dodatak antioksidansa neće pomoći ako je u ulju već počela oksidacija. Sve dok u ulju ima antioksidansa, on će djelovati na sprečavanje procesa oksidacije. Vrijeme djelotvornosti antioksidansa ovisi o vrsti antioksidansa, koncentraciji koja se dodaje, vrsti ulja i uvjetima čuvanja ulja.

Antioksidacijsko djelovanje nekog antioksidansa može se izraziti antioksidacijskim indeksom (AI) ili stabilizacijskim (zaštitnim) faktorom (PF, *protecting factors*) koji pokazuje koliko se puta poveća održivost nekog ulja dodatkom antioksidansa.

$$\text{Zaštitni faktor (PF)} = \text{IP}_{\text{inh}}/\text{IP}_0$$

AI = održivost ulja s dodanim antioksidansom / održivost ulja bez dodanog antioksidansa

IP_{inh} = indukcijski period uzorka ulja sa dodatkom antioksidansa (h)

IP_0 = indukcijski period uzorka ulja bez dodatka antioksidansa (h)

Indukcijski period (IP) ili vrijeme indukcije je broj sati potreban da ulje dostigne peroksidni broj 5 mmol O_2/kg . Neki antioksidansi u većoj koncentraciji djeluju suprotno te ubrzavaju oksidacijsko kvarenje ulja (Bandoniene i sur., 2000).

Vrste antioksidanasa

Pod **prirodne antioksidanse** ubrajaju se amino kiseline i dipeptidi, hidrolizati proteina, proteini topljivi u vodi, fosfolipidi, anorganske soli, tokoferoli i njihovi derivati, karotenoidi, askorbinska kiselina.

Najznačajniji su tokoferoli. Poznato je osam tokoferola, a najvažniji su α – tokoferol, β – tokoferol, γ – tokoferol i δ – tokoferol. Međusobno se razlikuju po svom biološkom i antioksidacijskom djelovanju. Najbolje vitaminsko djelovanje ima α – tokoferol koji je u dobio naziv vitamin E. To je antioksidans *in vivo* koji štiti nezasićene masne kiseline u organizmu od procesa oksidacije tako što sprječava nastajanje slobodnih radikala. Utjecajem temperature i UV svjetlosti dolazi do degradacije α – tokoferola. Antioksidacijsko djelovanje najviše pokazuju γ – tokoferol i δ – tokoferol. Koncentrati tokoferola dobivaju se iz prirodnih ulja, a dodani u većoj količini djeluju kao prooksidansi.

Kao antioksidansi koriste se i karotenoidi, askorbinska kiselina i u novije vrijeme ekstrakti iz biljnih materijala (voća, povrća, začinskih biljaka poput ružmarina, kadulje, zečenog čaja i drugih) koji su bogat izvor tokoferola, vitamina C, karotenoida i flavonoida čime povećavaju održivost ulja.

Začini kao kadulja i ružmarin pokazuju visoka antioksidacijska svojstva zbog prisustva fenolne grupe spojeva, a zadržavaju ih i pri visokoj temperaturi (98-194 °C).

Ružmarin se najviše primjenjuje od prirodnih antioksidansa, listići ružmarina sadrže 0,5 – 3% eteričnog ulja. Antioksidansi ekstrakta ružmarina su fenolni diterpenoidi: karnosol, karnosolna kiselina, rosmanol, eporosmanol, rosmadial i metil – karnosat, antioksidacijsko

svojstvo imaju i flavonoidi genkvanin i cirsimartin. Najznačajniji su karnosolna kiselina, karnosol i ružmarinska kiselina.

Glavni antioksidacijski sastojci u ekstraktu zekenog čaja su: (+) katehin, (+) galokatehin, (-) epikatehin, (-) epikatehin galat, (-)epigalokatehin i (-) epigalokatehin galat. Antioksidacijska aktivnost ekstrakta zelenog čaja ponaša se različito u različitim lipidnim sistemima.

Sintetski antioksidansi pripadaju skupini prehrambenih aditiva. Nisu prirodan sastojak hrane već se dobivaju kemijskim putem. U Hrvatskoj je uporaba aditiva, antioksidansa regulirana Pravilnikom o prehrambenim aditivima NN 81/2008 (MZSS, 2008).

U proizvodnji i preradi ulja sintetski antioksidansi koji se primjenjuju za stabilizaciju sirovih i rafiniranih biljnih ulja su butilhidroksianisol (BHA-E320), butilhidroksitoluen (BHT), grupa alkil estera galne kiseline (propil galat – PG, oktil galat – OG, dodecil galat), tercijarni butilhidrokinon (TBHQ).

2.5.2. Sinergisti

Sinergisti su kemijski spojevi koji sami po sebi nemaju antioksidacijsko djelovanje, ali dodani uz neki antioksidans produžuju njegovo djelovanje na. Uglavnom se dodaju na kraju procesa dezodorizacije. Najčešće se koriste organske kiseline (limunska, octena, askorbinska kiselina), askorбил palmitat, mono izopropil citrat i lecitin. Svaki sinergist ne odgovara svakom antioksidansu. Dobar sinergist uz tokoferole je askorbinska kiselina, askorбил palmitat i limunska kiselina.

Poznata su tri načina djelovanja sinergista:

1. Vežu tragove metala (Cu i Fe) i inaktiviraju ih, te sprečavaju njihovo prooksidacijsko djelovanje,
2. Daju vodikov atom antioksidansu i tako ga regeneriraju i produžuju vrijeme trajanja antioksidansa,
3. Sprječavaju djelovanje radikala antioksidansa na razgradnju peroksida- sinergist se veže na radikal antioksidansa i zaustavlja njegov utjecaj na razgradnju peroksida (Koprivnjak, 2006).

Sinergisti se još nazivaju sekundarni antioksidansi jer ne prevode izravno slobodne radikale u stabilne molekule, već posredno pridonose usporavanju oksidacijskog procesa kvarenja biljnog ulja.

2.6. METODE ODREĐIVANJA STUPNJA OKSIDACIJE ULJA

Procjenjivanje stupnja oksidacije ulja može se provoditi pomoću više metoda jer ne postoji jedinstvena metoda koja daje podatak o stupnju nastalih oksidacijskih promjena u biljnim uljima. Istovremenom primjenom više metoda koje daju ukupan sadržaj oksidacijskih promjena (primarnih i sekundarnih produkata oksidacije) možemo dobiti kompletan uvid u stupanj nastalih oksidacijskih promjena.

Metode određivanja stupnja oksidacije ulja dijele se u tri skupine:

1. Senzorske (organoleptičke) metode
2. Kemijske metode
3. Fizikalne metode

Senzorske metode određuju pojavu neugodnog mirisa i okusa ulja zbog oksidacije. Ove metode su dobar pokazatelj oksidacijske stabilnosti biljnih ulja, ali danas se radi na razvoju bržih i jednostavnijih metoda određivanja stupnja oksidacije ulja.

Postoje razne **fizikalne metode** određivanja stupnja oksidacije biljnih ulja.

UV – spektrofotometrija se primjenjuje za kvantitativnu ali i kvalitativnu analizu. Temelji se na ovisnosti energije zračenja o kemijskom sastavu tvari. Za određivanje u UV i IR dijelu spektra koriste se spektrofotometri. Apsorpcijski spektrometri su uređaji koji električnim putem mjere apsorbanciju. Omjer apsorpcijskog maksimuma hidroperoksida linolne kiseline i konjugiranih diena ($A_{232\text{ nm}}$) te apsorpcijskog maksimuma sekundarnih produkata oksidacije i konjugiranih triena ($A_{270\text{ nm}}$) zove se R – vrijednost. R – vrijednost je dobar pokazatelj kvalitete ulja.

$$R - \text{vrijednost} = A_{232\text{ nm}} / A_{270\text{ nm}}$$

$A_{232\text{ nm}}$ – apsorbancija na 232 nm

$A_{270\text{ nm}}$ – apsorbancija na 270 nm

Ukoliko je R – vrijednost niska, ulje sadrži više konjugiranih triena i sekundarnih produkata oksidacije, stoga to je pokazatelj lošije kvalitete ulja. Određivanje R – vrijednosti je moguće samo kod sirovih ulja. UV – spektrofotometrija je najraširenija metoda određivanja stupnja oksidacije ulja (Dimić i Turkulov, 2000).

IR – spektrofotometrija se nikada ne koristi sama za analizu nepoznatih uzoraka, nego se dopunjuje sa drugim metodama poput nuklearne magnetske rezonance i UV – spektrofotometrije.

Plinska kromatografija se najčešće koristi za nezasićene masne kiseline. Koristi se za određivanje hlapljivih spojeva kao što su aldehidi.

Indeks refrakcije je također metoda koja se upotrebljava za određivanje oksidacijskih promjena. Konjugirani dieni hidroperoksida i polimeri povećavaju indeks refrakcije.

Polarimetrija je kvantitativna i kvalitativna voltmetrijska metoda. Ova metoda se zasniva na pojavi polarizacije i depolarizacije radne elektrode pri elektrolizi analiziranog elektrolita. Ovdje se prati redukcija ili oksidacija ispitivanog uzorka na površini radne elektrode.

Neke od analitičkih metoda za procjenjivanje stupnja oksidacije prikazane su u **Tablici 1**.

Tablica 1 Analitičke metode za procjenjivanje oksidacijskog stupnja bijnih ulja (omogućuju određivanje količine primarnih i sekundarnih produkata oksidacije ulja) (Dimić i Turkulov, 2000).

| ANALITIČKA METODA | ISPITIVANI PARAMETAR |
|-------------------------------------|---|
| ORGANOLEPTIČKE (SENZORSKE) | Boja, miris, okus |
| KEMIJSKE METODE | |
| Peroksidni broj (Pbr) | Hidroperoksidi, peroksidi |
| TBK test (broj) | Malonaldehid |
| Karbonilni broj | Svi spojevi s karbonilnom skupinom |
| Anisidinski broj (Abr) | Svi isparljivi karbonilni spojevi (2 - enali, 2,4 - dieni) |
| Kreis-ov test | Epoksialdehidi i acetali |
| Kemijska luminiscencija | Primarni i sekundarni produkti oksidacije |
| Oksidacijska vrijednost (OV) | $OV = 2Pbr + Abr$, ukupni sadržaj primarnih i sekundarnih produkata oksidacije |
| FIZIKALNE METODE | |
| UV - spektrofotometrija | Konjugirani dieni i trieni |
| IR - spektrofotometrija | Primarni i sekundarni produkti oksidacije |
| NMR (nuklearna magnetska rezonanca) | Hidroperoksidi i alkoholi |
| Fluorescencija | Karbonilni spojevi (malonaldehid) i ketoni |
| GC - plinska kromatografija | Isparljivi spojevi |
| Indeks refrakcije | Primarni i sekundarni produkti oksidacije |
| Dielektrična konstanta | Primarni i sekundarni produkti oksidacije |
| Polarografija | Hidroperoksidi |
| Kulonometrija | Hidroperoksidi |

2.6.1. Kemijski pokazatelji stupnja oksidacije ulja i masti

Najčešći kemijski pokazatelji kvalitete biljnih ulja su:

Peroksidni broj (Pbr)

Najčešće primjenjivana metoda za određivanje stupnja oksidacije ulja je peroksidni broj.

Peroksidni broj označava razinu primarne oksidacije masnih kiselina i pokazuje količinu primarnih produkata oksidacije i izražava se u miliekvivalentima O_2 ili mmol O_2 /kg (Rac, 1964, Dimić i Turkulov, 2000). Najčešće se koristi jodometrijska metoda koja se zasniva na titrimetrijskom određivanju količine joda kojeg iz kalij – jodida oslobađaju peroksidi. Koristi se i kolorimetrijska metoda. Ukoliko je ulje namijenjeno daljnjem čuvanju peroksidni broj treba biti što niži, najbolje 0 mmol O_2 /kg jer i mala količina peroksida djeluje kao katalizator procesa autooksidacije i znatno smanjuje oksidacijsku stabilnost. Vrijednost peroksidnog broja se izračunava prema jednadžbi:

$$Pbr = (V_1 - V_0) * 5 / m \quad (\text{mmol } O_2/\text{kg})$$

V_1 = volumen otopine natrij-tiosulfata, $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,01 \text{ mol/L}$ utrošen za titraciju uzorka ulja (mL)

V_0 = volumen otopine natrij-tiosulfata utrošen za titraciju slijepe probe (mL)

m – masa uzorka ulja (g)

Prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima NN br. 41/12, u jestivim rafiniranim biljnim uljima dozvoljena je maksimalna vrijednost peroksidnog broja od 5 mmol O_2 /kg.

Anisidinski broj (Abr)

Anisidinski broj daje uvid u količinu karbonilnih spojeva koji predstavljaju sekundarne produkte oksidacije ulja (aldehidi) nastalih razgradnjom hidroperoksida. Nehlapljivi karbonilni spojevi negativno utječu na senzorska svojstva i oksidacijsku stabilnost ulja. Određivanje anisidinskog broja temelji se na reakciji p-anisidina sa višim nezasićenim aldehydima u kiselom mediju.

Ova metoda se koristi za ispitivanje kvalitete sirovih i jestivih ulja jer omogućuje potpuniju procjenu kvalitete, daje uvid u tzv. „oksidacijsku prošlost“ ulja. Veća vrijednost anisidinskog broja ukazuje na slabiju održivost ulja tako da ulje dobre kvalitete treba imati vrijednost anisidinskog broja manju od 10 (Rade i sur., 2001).

Oksidacijska vrijednost ulja (OV) ili Totox broj (TB)

Totox broj daje uvid u količinu i primarnih i sekundarnih produkata oksidacije ulja, a izračunava se iz vrijednosti anisidinskog i peroksidnog broja:

$$TB = 2 \text{ Pbr} + \text{Abr}$$

Pbr – peroksidni broj

Abr – anisidinski broj

2.7. OKSIDACIJSKA STABILNOST ULJA

U uvjetima podjednake izloženosti vanjskim čimbenicima, sposobnost različitih ulja da se odupru oksidacijskom kvarenju je interakcija unutarnjih čimbenika: stupnja nezasićenosti masnih kiselina od kojih je masnoća sastavljena, koncentracije i vrste antioksidanasa te koncentracije i vrste prooksidanasa koje ulje sadrži (Koprivnjak, 2006). Metode koje se koriste za određivanje održivosti ulja zasnivaju se na namjerno izazvanoj ubrzanoj oksidaciji ulja utjecajem temperature i zraka. Kao održivost ulja uzima se vrijeme (u satima) potrebno da uzorak dostigne određenu vrijednost peroksidnog broja. U praksi se najčešće primjenjuju sljedeće metode: Oven test ili Schaal Oven test, Swift test ili AOM test i Rancimat test.

Tijek ubrzane oksidacije ulja može se pratiti i određivanjem i drugih pokazatelja čije vrijednosti rastu tijekom oksidacije (K - vrijednosti, *p*-anisidinski broj, tiobarbiturni broj, nonanal), ili koje se smanjuju tijekom oksidacije (karoteni, ukupni fenoli).

2.7.1. Oven test ili Schaal Oven test

Oven test je jedna od najstarijih i najjednostavnijih metoda za ispitivanje održivosti ulja. Uzorci ulja se zagrijevaju u termostatu (ili u sušioniku) na temperaturi 60 ili 63 °C. U određenim vremenskim razmacima prati se porast peroksidnog broja ili senzorske promjene nastale oksidacijskim procesom kvarenja biljnog ulja. Rezultati ove metode se prikazuju kao vrijednost peroksidnog broja nakon određenog vremena držanja uzorka (u danima) pri određenoj temperaturi (jestiva ulja obično četiri dana). Utvrđeno je da jedan dan Oven testa odgovara stvarnoj održivosti ulja od 6 do 12 dana pri sobnoj temperaturi (oko 20 °C) (Dimić i Turkulov, 2000).

2.7.2. AOM (Active Oxygen Method) test ili Swift test

Kod ove metode uzorci ulja se zagrijevaju na 98 °C kroz koje prolazi struja zraka u Swift aparatu. Uzorci se uzimaju u određenim vremenskim razmacima i određuje se peroksidni broj. Održivost ulja se najčešće određuje do peroksidnog broja 5 mmol O₂/kg. Vrijednost peroksidnog broja od 5 mmol O₂/kg je granica pri kojoj je ulje još ispravno. Kvalitetna ulja dobre održivosti poslije 8 sati Swift testa moraju imati peroksidni broj manji od 5 mmol O₂/kg (Rade i sur., 2001).

2.7.3. Rancimat test

Oksidacijska stabilnost ulja kod Rancimat testa se određuje primjenom Rancimat uređaja u kojem dolazi do ubrzane oksidacije biljnih ulja uz povišenu temperaturu (100, 110 i 120 °C) i konstantan protok zraka kroz uzorak, pri čemu se na osnovu količine izdvojenih hlapljivih kiselina određuje indukcijski period (IP) u satima, indirektno mjerenjem porasta vodljivosti. Hlapljivi spojevi (kratkolančane lakohlapljive organske kiseline) koje nastaju oksidacijom ulja uvode se u deioniziranu vodu te se mjeri porast vodljivosti. Indukcijski period se određuje na osnovu količine izdvojenih kratkolančanih hlapljivih organskih kiselina. Također, indukcijski period pokazuje otpornost ulja prema oksidaciji. Što je vrijeme indukcije dulje, ulje ima bolju oksidacijsku stabilnost ili održivost.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitivanje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte *Oblica* uzgojene uz obalu mora i zaleđu Biograda. Pored toga, ispitivao se i utjecaj dodatka prirodnih antioksidanasa (ekstrakta zelenog čaja, ekstrakta nara, ekstrakta maslinovog lista, ekstrakta ružmarina tip OxyLess CS udjela 0,1% i 0,2% te eterično ulje rtanjskog čaja udjela 0,05%).

Istraživanje oksidacijske stabilnosti maslinovog ulja, te djelovanje dodatnih antioksidanasa provelo se testom ubrzane oksidacije ulja Oven testom (63 °C).

Prije istraživanja oksidacijske stabilnosti ispitivanog maslinovog ulja, određeni su parametri kvalitete (slobodne masne kiseline i peroksidni broj) primjenom standardnih metoda.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Materijali

Ekstra djevičansko maslinovo ulje sorte *Oblica*, uzgojeno uz obalu mora.

Ekstra djevičansko maslinovo ulje sorte *Oblica*, uzgojeno u zaleđu Biograda.

Za ispitivanje utjecaja dodanog antioksidansa na produženje oksidacijske stabilnosti maslinovog ulja korišteni su prirodni antioksidansi:

- Ekstrat zelenog čaja (0,1% i 0,2%)
- Ekstrakt nara - potrebno otopiti u malo vode (0,1% i 0,2%)
- Ekstrakt ružmarina (OxyLess CS) (0,1% i 0,2%)
- Ekstrakt maslinovog lista (0,1% i 0,2%)
- Eterično ulje rtanjskog čaja (0,05%)

3.2.2. Metode rada

3.2.2.1. Priprema uzoraka

Izvagati maslinovo ulje u čašicu u kojoj je već izvagan antioksidans (da se spriječe gubici). Promiješati staklenim štapićem i zagrijavati uz miješanje 30 minuta na 70-80°C.

Način uzorkovanja

Tijekom 4 dana ispitivanja oksidacijske stabilnosti maslinovog ulja uvijek u isto vrijeme (svakih 24 sata) izvaditi uzorak, homogenizirati, uzorkovati i vratiti natrag u termostat.

Na **Slici 2** je prikazan termostat za određivanje održivosti biljnih ulja.



Slika 2 Termostat

3.2.2.2. Određivanje slobodnih masnih kiselina (SMK)

Biljna ulja nemaju neutralnu pH sredinu jer pored neutralnih triacilglicerola sadrže i određeni udio slobodnih masnih kiselina. Slobodne masne kiseline nastaju hidrolitičkom razgradnjom triacilglicerola djelovanjem lipolitičkih enzima (lipaza) na estersku vezu u molekuli. Udio slobodnih masnih kiselina ovisi o načinu dobivanja ulja, upotrijebljenim sirovinama i uvjetima čuvanja. U uljima se određuje količina alkalija koja je potrebna za neutralizaciju slobodnih masnih kiselina.

Kiselost ulja može se izraziti kao:

- Kiselinski broj,
- Kiselinski stupanj,
- Postotak oleinske kiseline.

Slobodne masne kiseline u uzorcima maslinovog ulja su određene standardnom metodom koja se temelji na principu titracije s otopinom natrij-hidroksida $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/L}$. Udio masnih kiselina je izražen kao % oleinske kiseline, a izračunava se prema formuli

$$\text{SMK (\% oleinske kiseline)} = V * c * \frac{M}{10} * m$$

V = utrošak otopine NaOH za titraciju uzorka (mL).

c - koncentracija otopine natrij-hidroksida za titraciju, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/L}$

M - molekulska masa oleinske kiseline, $M = 282 \text{ g/mol}$

m - masa uzorka za ispitivanje (g)

3.2.2.3. Određivanje peroksidnog broja (Pbr)

Jedan od načina određivanja oksidacijskog stupnja ulja je određivanje peroksidnog broja. Peroksidnim brojem određujemo primarne produkte oksidacije ulja. U ispitivanim uzorcima peroksidni broj je određen standardnom metodom. Rezultat je izražen kao broj milimola aktivnog kisika koji potječe od nastalog peroksida prisutnih u 1 kg ulja (mmolO_2/kg).

Princip određivanja je da se uzorak ulja otopi u otopini ledene octene kiseline i kloroforma, te se dodaje otopina kalij – jodida (KI). Jod se oslobađa djelovanjem peroksida, te se

oslobođeni jod titrira natrij – tiosulfatom uz škrob kao indikator. Završna točka titracije se određuje jodometrijski (vizualno) nestankom plavog obojenja u trajanju od 30 sekundi.

Peroksidni broj se izračunava prema jednadžbi:

$$Pbr = (V_1 - V_0) \cdot 5/m \text{ (mmol O}_2\text{/kg)}$$

V_1 = volumen otopine natrij-tiosulfata, $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,01 \text{ mol/L}$ utrošen za titraciju uzorka ulja (mL)

V_0 = volumen otopine natrij-tiosulfata utrošen za titraciju slijepe probe (mL)

m – masa uzorka ulja (g)

3.2.2.4. Određivanje oksidacijske stabilnosti ulja Oven test

Jedna od najstarijih metoda za određivanje oksidacijske stabilnosti biljnih ulja je Oven test. Primjenom ove metode, uzorci ulja su zagrijavani u sušioniku (Binder) na temperaturi 63°C. Prati se porast peroksidnog broja ili senzorske promjene nastale oksidacijskim kvarenjem maslinovog ulja u određenim vremenskim razmacima. Na početku testa je određen peroksidni broj uzorka ulja i dalje svakih 24 sata tijekom 4 dana.

Rezultati Oven testa su prikazani kao vrijednost peroksidnog broja ($\text{mmolO}_2\text{/kg}$) nakon određenog vremena držanja uzorka pri temperaturi 63°C, odnosno tijekom četiri dana trajanja testa.

4. REZULTATI

Tablica 2 Početne kemijske karakteristike ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte *Oblica*

| Vrsta ulja | SMK (%) | Pbr (mmolO ₂ /kg) |
|---|---------|------------------------------|
| Ekstra djevičansko maslinovo ulje (uz obalu mora) | 0,65 | 3,00 |
| Ekstra djevičansko maslinovo ulje (zaleđe Biograda) | 0,70 | 3,88 |

SMK - slobodne masne kiseline (%)

Pbr - peroksidni broj (mmolO₂/kg)

Tablica 3 Utjecaj dodatka prirodnih antioksidanasa na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte *Oblica*, područje uzgoja masline uz obalu mora.

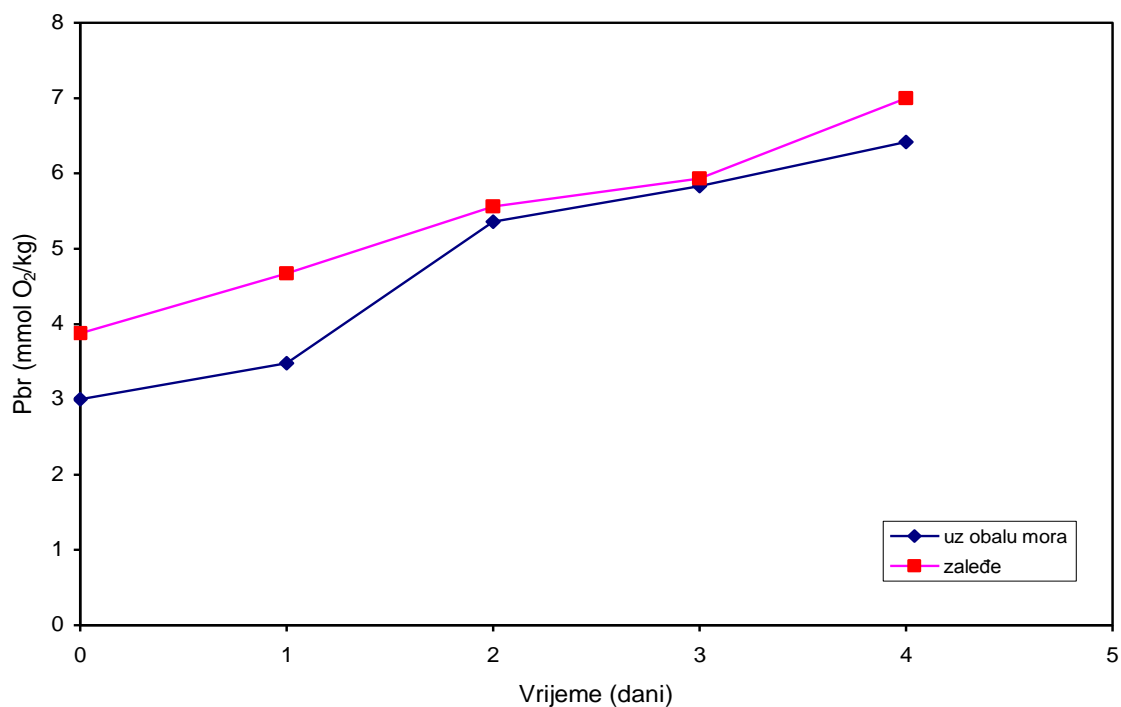
| UZORCI | Koncentracija antioksidansa (%) | Pbr (mmol O ₂ / kg) | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | | 0. dan | 1. dan | 2. dan | 3. dan | 4. dan |
| Ekstra djevičansko maslinovo ulje | - | 3,00 | 3,48 | 5,36 | 5,83 | 6,42 |
| Ekstrakt ružmarina (OxyLess CS) | 0,1% | 3,00 | 3,36 | 3,47 | 4,33 | 4,50 |
| | 0,2% | | 3,22 | 3,25 | 3,32 | 3,96 |
| Ekstrakt zelenog čaja | 0,1% | 3,00 | 3,39 | 3,54 | 4,05 | 4,50 |
| | 0,2% | | 3,07 | 3,25 | 3,75 | 3,92 |
| Ekstrakt nara | 0,1% | 3,00 | 3,36 | 3,81 | 5,50 | 6,86 |
| | 0,2% | | 3,57 | 4,29 | 5,13 | 6,63 |
| Ekstrakt maslinovog lista | 0,1% | 3,00 | 3,80 | 5,45 | 6,54 | 7,07 |
| | 0,2% | | 3,75 | 4,66 | 5,50 | 6,31 |
| Eterično ulje rtanjskog čaja | 0,05% | 3,00 | 3,15 | 4,37 | 5,23 | 6,00 |

Pbr – peroksidni broj (mmol O₂ / kg)

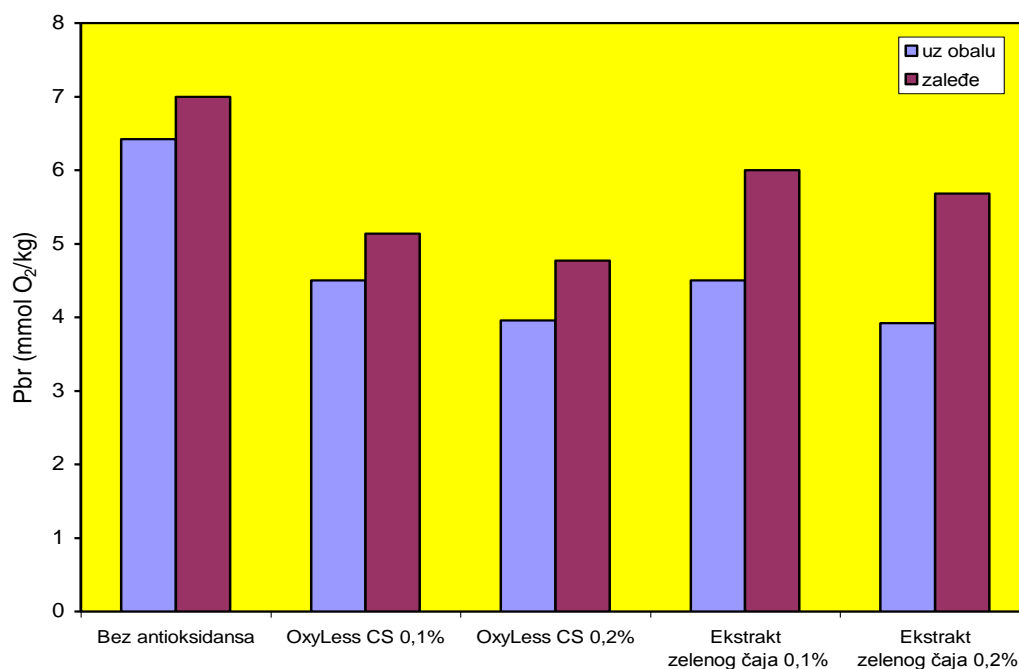
Tablica 4 Utjecaj dodatka prirodnih antioksidanasa na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte *Oblica*, područje uzgoja masline u zaleđu Biograda.

| UZORCI | Koncentracija antioksidansa (%) | Pbr (mmol O ₂ / kg) | | | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| | | 0. dan | 1. dan | 2. dan | 3. dan | 4. dan |
| Ekstra djevičansko maslinovo ulje | - | 3,88 | 4,67 | 5,56 | 5,93 | 7,00 |
| Ekstrakt ružmarina (OxyLess CS) | 0,1% | 3,88 | 4,23 | 4,65 | 4,81 | 5,14 |
| | 0,2% | | 3,90 | 4,45 | 4,75 | 4,77 |
| Ekstrakt zelenog čaja | 0,1% | 3,88 | 4,95 | 4,99 | 5,08 | 6,00 |
| | 0,2% | | 4,61 | 4,72 | 5,00 | 5,68 |
| Ekstrakt nara | 0,1% | 3,88 | 4,45 | 5,25 | 5,50 | 6,50 |
| | 0,2% | | 4,71 | 5,14 | 5,32 | 6,67 |
| Ekstrakt maslinovog lista | 0,1% | 3,88 | 4,71 | 5,37 | 6,13 | 6,86 |
| | 0,2% | | 4,95 | 5,63 | 6,63 | 7,27 |
| Eterično ulje rtanjskog čaja | 0,05% | 3,88 | 4,41 | 5,88 | 6,00 | 6,50 |

Pbr – peroksidni broj (mmol O₂ / kg)



Slika 3 Utjecaj lokacije maslinika, područja uzgoja masline sorte *Oblica* na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja tijekom 4 dana Oven testa.



Slika 4 Utjecaj dodatka ekstrakta zelenog čaja i ekstrakta ružmarina (OxyLess CS) na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte *Oblica*, uzgojene uz more i u zaleđu, nakon 4 dana Oven testa.

5. RASPRAVA

Rezultati ispitivanja utjecaja lokacije maslinika (uz obalu mora, u zaleđu Biograda) i dodatka antioksidanasa na oksidacijsku stabilnost ili održivost ulja masline sorte *Oblica* prikazani su u Tablicama 2-4 i na Slikama 3-4.

U Tablici 2 vidljive su vrijednosti osnovnih parametara kvalitete (SMK i Pbr) ispitivanih ekstra djevičanskih maslinovih ulja (uz obalu mora, u zaleđu Biograda). Izračunate vrijednosti SMK i Pbr oba maslinova ulja ukazuju na dobru kvalitetu ovih ulja. Niske vrijednosti ovih parametara kvalitete pokazuju da u sirovini (plodu masline) nije došlo do značajne hidrolitičke razgradnje triacilglicerola što rezultira porastom kiselosti ulja niti do većeg oksidacijskog kvarenja ulja tijekom skladištenja i prerade ploda masline.

Ispitivanje oksidacijske stabilnosti ekstra djevičanskog maslinovog ulja (područje uzgoja masline uz obalu mora) primjenom testa ubrzane oksidacije ulja (Oven test) tijekom 4 dana pri 63 °C prikazano je u Tablici 3.

Dobiveni rezultati pokazuju određenu razliku stabilnosti ulja tj. otpornosti prema oksidacijskom kvarenju. Tijekom provedbe testa dolazi do postepenog porasta vrijednosti Pbr te je nakon 4 dana testa Pbr iznosi 6,42 (mmolO₂/kg) ulja. Dodatkom ispitivanih prirodnih antioksidanasa udjela 0,1% u maslinovo ulje zapaža se da ekstrakt ružmarina (OxyLess CS) i ekstrakt zelenog čaja podjednako utječu na porast održivosti (stabilnosti) maslinovog ulja, Pbr nakon 4 dana testa ima vrijednost 4,50 (mmolO₂/kg) ulja. Dakle, ovi antioksidansi povećavaju otpornost ovog ulja prema oksidacijskom kvarenju u odnosu na ulje bez dodatka antioksidanasa (kontrolni uzorak). Dodatkom ekstrakta nara i ekstrakta maslinovog lista (udjela 0,1%) u maslinovo ulje ne postiže se porast stabilnosti ulja. Održivost ulja se smanjuje, to znači da ovi antioksidansi nemaju antioksidacijsku aktivnost u ovom ulju, Pbr je nakon 4 dana testa veći od kontrolnog uzorka ulja.

Porastom koncentracije (udjela) ovih prirodnih antioksidanasa ekstrakta ružmarina i ekstrakta zelenog čaja sa 0,1% na 0,2% dolazi do još većeg porasta stabilnosti maslinovog ulja, vrijednost Pbr se nakon 4 dana testa još snižava na 3,96 mmolO₂/kg (ružmarin) i 3,92 mmolO₂/kg (zeleni čaj) u odnosu na kontrolni uzorak. Ovdje se zapaža da ekstrakt zelenog čaja ima nešto bolju efikasnost zaštite ulja od oksidacijskog kvarenja (niži je Pbr).

Također dodatkom većeg udjela (0,2%) ekstrakta nara u maslinovo ulje ne postiže se veća održivost ili stabilnost ulja (Pbr je veći od kontrolnog uzorka nakon 4 dana testa). Primjena ekstrakta maslinovog lista većeg udjela (0,2%) dovodi do neznatno veće stabilnosti maslinovog ulja (Pbr je malo niži od kontrolnog uzorka).

Dodatkom eteričnog ulja rtanjskog čaja (udjela 0,05%) postiže se veća stabilnost ili održivost maslinovog ulja jer je Pbr nakon 4 dana testa 6,00 (mmolO₂/kg), dakle niže vrijednosti u odnosu na kontrolni uzorak ulja.

Analizirajući ove dobivene rezultate možemo zaključiti da dodatkom ekstrakta zelenog čaja dolazi do većeg porasta stabilnosti maslinovog ulja u odnosu na druge ispitivane prirodne antioksidanse. Porast stabilnosti ovog ulja je veći dodatkom 0,2% nego 0,1%.

U Tablici 4 prikazan je utjecaj dodatka prirodnih antioksidanasa na oksidacijsku stabilnost (održivost) ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte *Oblica*, područje uzgoja masline u zaleđu Biograda.

Ovo ispitivano maslinovo ulje proizvedeno iz *Oblice* uzgojene u zaleđu također pokazuje dobru stabilnost tj. otpornost prema oksidacijskom kvarenju, vrijednost Pbr nakon 4 dana testa je 7,00 mmolO₂/kg. Dodatkom ispitivanih prirodnih antioksidanasa, udjela 0,1% i 0,2%, povećava se stabilnost maslinovog ulja, osim dodatkom ekstrakta maslinovog lista (0,2%) gdje je postignuta veća vrijednost Pbr (7,27 mmolO₂/kg) u odnosu na kontrolni uzorak ulja bez dodanog antioksidansa.

Korištenjem antioksidansa ekstrakta ružmarina (OxyLess CS), koncentracije 0,1% postiže se veći porast stabilnosti ili održivosti maslinovog ulja (Pbr je nakon 4 dana testa 5,14 mmolO₂/kg) u odnosu na primjenu ekstrakta zelenog čaja, ekstrakta nara i ekstrakta maslinovog lista iste koncentracije. Ekstrakt zelenog čaja pokazuje bolju razinu zaštite od oksidacije maslinovog ulja nego ekstrakt nara, a ekstrakt maslinovog lista (0,1%) neznatno povećava zaštitu (Pbr 6,86 mmolO₂/kg) u odnosu na kontrolni uzorak.

Primjenom antioksidanasa ekstrakta ružmarina i zelenog čaja veće koncentracije, 0,2%, u maslinovom ulju dodatno se povećava stabilnost ulja prema oksidaciji. I kod te koncentracije veću učinkovitost zaštite ulja pokazuje ekstrakt ružmarina (4,77 mmolO₂/kg) u odnosu na ekstrakt zelenog čaja (5,68 mmolO₂/kg).

Dodatkom ekstrakta nara (0,2%) i ekstrakta maslinovog lista (0,2%) u maslinovo ulje postiže se manja efikasnost zaštite ulja od oksidacijskog kvarenja (veći je Pbr) nego primjenom 0,1%.

Eterično ulje rtanjskog čaja dodan u udjelu 0,05% u ovo maslinovo ulje neznatno poboljšava stabilnost ulja, Pbr je nakon 4 dana testa 6,50 (mmolO₂/kg) ulja što je ista razina zaštite kao i dodatak ekstrakta nara (0,1%).

Na Slici 3 prikazan je utjecaj lokacije maslinika, područje uzgoja *Oblice* (uz obalu mora i u zaleđu Biograda), na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja tijekom 4 dana Oven testa. Iz dobivenih vrijednosti Pbr ulja može se vidjeti da maslinovo ulje dobiveno iz *Oblice* uzgojene uz obalu mora ima nešto veću stabilnost tj. otpornost prema oksidacijskom kvarenju (niži Pbr) u odnosu na plod uzgojen u zaleđu na većoj nadmorskoj visini. Ova pojava može se tumačiti teorijskim spoznajama da se više nadmorske visine i hladnija područja uzgoja masline odražavaju u većoj zastupljenosti nezasićenih te manje zasićenih masnih kiselina. Hladnija područja potiču tijekom zrenja ploda masline nakupljanje oleinske kiseline na uštrb palmitinske i linolne masne kiseline.

Toplija područja uzgoja masline potiču nakupljanje većih količina ukupnih fenolnih tvari u ulju koje svojim antioksidacijskim djelovanjem povećavaju stabilnost ulja prema oksidaciji (Koprivnjak, 2006).

Na Slici 4 vidljivi su rezultati ispitivanja utjecaja dodatka ekstrakta zelenog čaja i ekstrakta ružmarina (OxyLess CS) (0,1% i 0,2%) na oksidacijsku stabilnost ekstra djevičanskog maslinovog ulja sorte *Oblica*, uzgojene uz more i u zaleđu Biograda, nakon provedbe 4 dana Oven testa.

Maslinovo ulje sorte *Oblica* uzgojeno uz obalu mora pokazuje veću stabilnost ili održivost (niži Pbr) u odnosu na ulje dobiveno iz masline uzgojene u zaleđu.

Na slici je vidljivo da dodani ekstrakt ružmarina OxyLess CS i ekstrakt zelenog čaja, kod obje koncentracije, bolje štite od oksidacije maslinovo ulje dobiveno iz ploda uzgojenog uz obalu mora nego uzgojenog u zaleđu.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata ispitivanja utjecaja lokacije maslinika i dodatka prirodnih antioksidanasa na oksidacijsku stabilnost ulja masline sorte *Oblica* mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Lokacija maslinika, odnosno područje uzgoja ploda masline sorte *Oblica* utječe na oksidacijsku stabilnost ili održivost ekstra djevičanskog maslinovog ulja.
2. Maslinovo ulje dobiveno iz *Oblice* uzgojene uz obalu mora ima veću stabilnost prema oksidacijskom kvarenju (niži Pbr) u odnosu na plod masline uzgojen u zaleđu na većoj nadmorskoj visini.
3. Dodatak prirodnog antioksidansa ekstrakta ružmarina OxyLess CS i ekstrakta zelenog čaja, udjela 0,1% i 0,2% te eteričnog ulja rtanjskog čaja 0,05%, utječe na porast stabilnosti maslinovog ulja dobivenog iz *Oblice* uzgojene uz obalu mora.
4. Najveću efikasnost zaštite maslinovog ulja (*Oblica* uz obalu mora) postignuta je dodatkom ekstrakta zelenog čaja (0,2%).
5. Ekstrakt maslinovog lista i ekstrakt nara ne utječe na porast stabilnosti maslinovog ulja (uz obalu mora).
6. Ispitivani prirodni antioksidansi dodani u maslinovo ulje, dobiveno iz *Oblice* uzgojene u zaleđu, utječu na porast stabilnosti ulja (osim ekstrakta maslinovog lista 0,2%), Pbr je niži u odnosu na kontrolni uzorak.
7. Najveću efikasnost zaštite maslinovog ulja (*Oblica* iz zaleđa) postignuta je dodatkom ekstrakta ružmarina OxyLess CS (0,2%).
8. Ekstrakt zelenog čaja osigurava veću razinu zaštite maslinovog ulja (*Oblica* iz zaleđa) u odnosu na ekstrakt nara i ekstrakt maslinovog lista.
9. Eterično ulje rtanjskog čaja (0,05%) postiže istu efikasnost zaštite maslinovog ulja kao i dodatak ekstrakta nara (0,1%).

7. LITERATURA

- Angerosa F., Servili M., Selvaggini R., Taticchi A., Esposto S., Montedoro G.F.: Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality, J. Chromatogr. A. 1054, 2004.
- Aparicio A., Ferperio L., Alonso V.: Effect of climate on the chemical composition of virgin olive oil. -Anal-Chim. Acta, 229, 1994.
- Bandoniene D., Pukalaskas A., Venskutonis P., P.R. Gruzdiene: Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil. Food Res. Int., 33, 2000.
- Benčić Đ., Čoga L., Krapac M., Moslavac T.: Utjecaj lokacije maslinika na masno-kiselinski sastav ekstra djevičanskih maslinovih ulja sorti *Buža* i *Leccino* u Istri, Glasnik zaštite bilja 2009.
- Benčić Đ., Perasović I., Šindrak Z.: Morfološka svojstva četiriju fenotipova masline (*Olea europaea* L., cv. *Oblica*) nađenih u masliniku blizu Kaštel Staroga u Dalmaciji, Glasnik zaštite bilja, 2010.
- Benčić Đ., Čoga L., Krapac M., Moslavac T.: Utjecaj roka berbe na masno-kiselinski sastav ekstra djevičanskih maslinovih ulja sorti *Buža* i *Leccino* u Istri, Glasnik zaštite bilja, 2009.
- Broadbent, C.J., Pike, O.A.: Oil stability indeks correlated with sensory determination of oxidative stability in canola oil. Journal of the American Oil Chemists Society 80, 2003.
- Cucurachi A., : Influence of variety of olive on the fatty acid composition of the oil. Rivista Italiana Sostanze Grasse, 42, 1965.
- Di Giovacchino L.: Technological Aspects. U: Handbook of olive oil: Analysis and properties, Aspen Publishers, Maryland, 2000.
- Dimić E., Turkulov J.: Kontrola kvalitete u tehnologiji jestivih ulja, Novi Sad, 2000.
- Fregapane G., Lavelli V., Leon S., Kapuralin J., Salvador M.D.: Effect of filtration on virgin olive oil stability during storage, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 108, 2006.
- Koprivnjak O.: Djevičansko maslinovo ulje od masline do stola. MIH d.o.o., Poreč, 2006
- Marsilio V., Lanza B., De Angelis M.: Olive cell wall components: physical and biochemical changes during processing, J.Sci.Food Agric. 70, 1996.
- Mimica A.: Čovjek i maslina, Omiš, 1991.

M.I. Minguez-Mosquera, J. Garido-Fernandez: Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruit (*Olea europaea*), *J. Agric. Food Chem.* 37, 1989.

Moslavac T., Pozderović A., Pichler A., Volmut K.: Utjecaj propil galata i ekstrakta ružmarina na oksidacijsku stabilnost smjese biljnih ulja. *Croat. J. Food. Sci. Technol.*, 2010.

Moussa Y.M., Gerasopoulos D., Metzidakis I., Kiritsakis A.: Effect of altitude on fruit and oil quality characteristics of "Mastodoides" olives, *J. Sci. Food Agric.* 71, 1996.

Mulinacci N., Giaccherini C., Innocenti M., Romani A., Vincieri F.F., Marotta F., Mattei A.: Analysis of extra virgin olive oils from stoned olives, *J. Sci. Food Agric.*, 4, 2005.

NN 41/12. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja. Pravilnik o jestivim uljima i mastima.

NN 81/08. Ministarstvo zdravstva o socijalne skrbi uz sukladnost ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja. Pravilnik o prehrambenim aditivima.

Osman M., Metzidakis I., Gerasopoulos D., Kiritsakis A.: Qualitative changes in olive oil of fruits collected from trees grown at two altitudes, *Riv. Ital. Sost. Grasse*, 71, 1994.

Oštrić-Matijašević B., Turkulov J.: Tehnologija ulja i masti, Novi Sad, 1980.

Pravilnik o uljima od ploda i komine maslina, *Narodne novine* 63, 2006.

Rac M.: Ulja i masti, sirovine, kemija i tehnologija jestivih ulja i masti, Beograd, 1964.

Rade D., Škevin D.: Maslinovo ulje i zdravlje- važnost maslinovog ulja u prehrani, *Popularni stručni članci iz područja PBN-a, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb*, 2004.

Rade D., Mokrovčak Ž., Štrucelj D.: Priručnik za vježbe iz kemije i tehnologije lipida, Durieux, Zagreb, 2001.

Strikić, F., Bandelj Dunja, Perica, S., Čmelik, Z., Šatović, Z., Javornik Branka: Genetic variation within the olive (*Olea europaea* L.) cultivar "Oblica" detected using AFLP markers. V International Symposium on Olive Growing, Izmir, Turska (in press), 2004.

Škevin D., Desanka R., Štrucelj D., Mokrovčak Ž., Nađeral S., Benčić D.: The influence of variety and harvest time on the bitterness and phenolic compounds of olive oil. *Eur. J. Lipid Sci Technol.* 105, 2003.

Vidyasagar K., Arya SS, Premevali KS, Parihar DB, Nath H, *J. Food Sci. Technol.*, 11, 73, 1974

